

DOI: 10.13376/j.cbls/2022004

文章编号: 1004-0374(2022)01-0039-06

细菌多糖结合疫苗的研究进展

邓国英¹, 桑彤², 杨淑凤^{1*}

(1 大连医科大学微生物学教研室, 大连 116044; 2 大连医科大学临床医学(“5+3”一体化)专业2019级, 大连 116044)

摘要: 多糖结合疫苗 (glycoconjugate vaccines) 是指具有可变结构和数量的多糖单元与非糖单元 (蛋白质或短肽、脂类) 通过共价连接形成的疫苗, 以蛋白质-多糖结合疫苗为主。细菌的多糖结合疫苗通过直接免疫保护和群体免疫, 显著减低了由细菌侵袭性感染所致的肺炎和脑膜炎的发病率和病死率。该文从组成和免疫机制、合成方法和面临的问题等方面重点论述了已上市的以及正处于临床试验阶段的几种细菌蛋白多糖疫苗, 对细菌多糖结合疫苗的全面认识有助于设计更为合理的疫苗。

关键词: 疫苗; 糖结合疫苗; 荚膜多糖; 侵袭性感染; 群体免疫

中图分类号: R392 **文献标志码:** A

Recent progress in the field of bacterial polysaccharide conjugate vaccines

DENG Guo-Ying¹, SANG Tong², YANG Shu-Feng^{1*}

(1 Department of Microbiology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;
2 2019 Grade, “5+3” Clinical medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Glycoconjugate vaccines are the compounds which consist of carbohydrates of varying complexity and size, covalently linked to non-sugar moieties such as proteins, peptides, and lipids. Bacterial polysaccharide conjugate vaccines have markedly decreased the global morbidity and mortality caused by bacterial meningitis and pneumonia, through direct immuno-protection and herd immunity. This review focuses on compositions, vaccine-induced immunity, synthetic methods, and characteristics of the several bacterial polysaccharide conjugate vaccines including licensed and being on trial.

Key words: vaccine; glycoconjugate vaccines; capsular polysaccharides (CPS); invasive infection; herd immunity

具有荚膜或者微荚膜结构的细菌可在儿童中引起重症侵袭性感染, 表现为细菌性肺炎或细菌性脑膜炎, 例如流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟球 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和 B 群链球菌 (group B *Streptococcus*, GBS) 等。位于细菌最外侧的荚膜多糖 (capsular polysaccharides, CPS) 或微荚膜多糖等细菌胞外多糖是造成细菌侵袭性感染的重要毒力因子, 同时也是防控这些细菌感染的疫苗的主要抗原成分^[1]。由于这些多糖大多属于胸腺非依赖抗原 (T-independent antigen, Ti), 不能形成免疫记忆 B 细胞, 尤其在 2 岁以下的婴幼儿人群不能诱导出足够的保护力, 因此可采用多糖结

合疫苗 (glycoconjugate vaccines) 策略^[2]: 将具有可变结构和数量的多糖单元与非糖单元 (蛋白质或短肽、脂类) 通过共价连接形成疫苗, 多以蛋白质-多糖结合为主。非糖单元发挥类似佐剂的作用, 激活辅助性 T 细胞继而促进 B 细胞成熟分化形成记忆, 从而提供长期免疫保护。目前上市使用的细菌多糖结合疫苗主要针对肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟球菌以及伤寒沙门菌 (表 1); 也有处在不同临床试验阶段的疫苗, 例如肺炎克雷伯荚膜多

收稿日期: 2021-07-26; 修回日期: 2021-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81801981)

*通信作者: E-mail: shufengyang78@163.com; Tel: 0411-86110303

糖结合疫苗、B群链球菌荚膜多糖结合疫苗等。表1详列了目前上市的主要细菌多糖结合疫苗。近几十年,细菌多糖结合疫苗的接种显著地降低了这些

细菌侵袭性感染造成的细菌性肺炎和脑膜炎的发病率和病死率,也很大程度上降低了耐药细菌的传播。本文将对细菌荚膜多糖疫苗的免疫机制、合成方法

表1 目前商用的细菌多糖结合疫苗概述

疫苗名称	多糖单元	非糖单元	针对人群	最早批准时间
肺炎链球菌多糖结合疫苗(<i>pneumococcus conjugate vaccine</i> , PCV) ^[5-7]				
PCV7	血清型4、6B、9V、14、18C、19F、23F	CRM197	2岁以下儿童; 5岁以下易感儿童	2000年
PCV10	PCV7+1、5、7F	TT/DT/HiD	42天~2岁儿童	2009年
PCV13	PCV10+3、6B、19A	CRM197	42天~6岁儿童; 65岁以下成人	2010年
PCV15	PCV13+22F、33F	CRM197	42天~89天婴幼儿; 50岁以上成人	2020年III期临床
PCV20	PCV13+8、10A、11A、12F、15B、22F、33F	CRM197	18~49岁成人 60~64岁老年人	2021年Ib临床 2020年
脑膜炎奈瑟球菌多糖结合疫苗(<i>meningococcal conjugate vaccine</i> , MCV) ^[8-10]				
MenC	血清型C	CRM197/DT	3~5月婴儿	1999年
MenACWY-D	血清型A、C、Y、W	DT	9~18月/2~55岁	2005年
Hib-MenC-TT	PRP/血清型C	TT	6周~2岁	2006年
Hib-MenCY-TT	PRP/血清型C、Y	TT	6周~18月	2006年
MenACWY-CRM	血清型A、C、Y、W	CRM197	2~18月/2~55岁	2010年
MenA-TT (MenAfriVac)	血清型A	TT	1~29岁	2010年(成人剂)/ 2014年(儿童剂)
MenACYW	血清型A、C、Y、W	TT	≥6周	2016年
MenACWYX	血清型A、C、Y、W、X	TT/CRM197		有望2021年上市
MenB-FHbp	血清型B	FHbp	10~25岁B群高风险	2013年
MenB-4C	血清型B	FHbp、NhbA、 NadA、PorA	≥2月; 10~25岁B群高风险	2015年
流感嗜血杆菌杆菌多糖结合疫苗(<i>Haemophilus influenzae type b vaccine</i> , Hib) ^[11-14]				
PRP-CRM	PRP	CRM197	6周~4岁	2009年
PRP-D	PRP	DD	2月~5岁	2018年
PRP-T	PRP	TT	6周/2月以上	1993年/2016年
PRP-OMPC	PRP	OMPC	6周/2月以上	2019年
DTaP-IPV/Hib	PRP	TT	≥6周	2013年
伤寒结合疫苗 (<i>typhoid conjugate vaccine</i> , TCV) ^[15-17]				
Vi-rEPA	Vi微荚膜多糖	rEPA	≥2岁	2001年
Vi-TT	Vi微荚膜多糖	TT	≥6个月	2015年
Vi-DT	Vi微荚膜多糖	DT	≥6个月	2020年II期临床
Vi-CRM197	Vi微荚膜多糖	CRM197	≥6个月	2011年II期临床
OPS/COPS结合疫苗	O-多糖/核心多糖	TT/CRM197/鞭毛 蛋白/微孔蛋白		2020年动物实验

CRM197: 白喉毒素的交叉反应物(cross-reacting material); TT: 破伤风类毒素(tetanus toxoid); DT: 白喉类毒素(diphtheria toxoid); OMPC: 脑膜炎耐瑟球菌外膜蛋白复合物(meningococcal outer membrane protein complex); HiD: 流感嗜血杆菌蛋白D (*H. influenzae* protein D); MenC: 脑膜炎耐瑟球菌C型; MenA: 脑膜炎耐瑟球菌A型; MenW: 脑膜炎耐瑟球菌W型; MenY: 脑膜炎耐瑟球菌Y型; MenB: 脑膜炎耐瑟球菌B型; FHbp: H因子结合蛋白(factor H binding protein); NhbA: 奈瑟菌肝素结合抗原(neisserial heparin binding antigen); NadA: 耐瑟菌黏附素A (neisserial adhesin A); PorA: 孔蛋白A (porin A); PRP: 多聚核糖基核糖醇磷酸盐(polyribosylribitol phosphate); DTaP-IPV/Hib: 含脊髓灰质炎灭活疫苗、无细胞百白破疫苗和B型流感嗜血杆菌疫苗的五联疫苗; rEPA: 重组铜绿假单胞菌外毒素A (recombinant exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*); OPS: O-多糖(O-polysaccharide); COPS: 核心多糖(core O-polysaccharide)。

和面临问题等展开论述, 对细菌多糖结合疫苗的全面了解也有助于疫苗设计策略的优化。

1 组成和免疫机制

1.1 结合疫苗的多糖单元

具有荚膜或者微荚膜结构的病原菌可造成侵袭性感染, 荚膜多糖或微荚膜多糖等胞外多糖是关键的侵袭性物质, 因此外周循环中存在针对这些侵袭力的中和抗体是阻断病原菌侵袭性感染的关键。多糖结合疫苗中的多糖单元是其主要抗原成分, 同时这些多糖也是细菌分血清型的依据。病原菌的胞外多糖大多为弱免疫原性, 属于胸腺非依赖抗原, 直接与 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 交联后, 刺激 B 细胞产生以 IgM 为主并含有少量 IgG2 的免疫球蛋白^[3], 不会形成免疫记忆。2 岁以下的儿童脾脏 C3d 受体不成熟, B 细胞上的 CD21 与 C3d 的作用受到抑制从而影响多糖免疫应答, 因此针对单独的多糖抗原无法产生足够的免疫应答^[4], 而 2 岁以下儿童又是这些病原菌侵袭性感染的高危人群。因此, 多糖结合疫苗的开发策略是借助非糖单元如蛋白质等与多糖抗原共价结合, 将多糖抗原转换为胸腺细胞依赖抗原 (T-dependent antigen, Td)。经典的多糖结合疫苗的免疫机制^[3]是多糖结合疫苗与 BCR 交联后, 在 B 细胞胞内体将多糖结合物酶解为糖肽复合物, 糖肽复合物中的肽段能被 B 细胞表面 MHC II 类分子递呈给 CD4⁺ T 细胞, T 细胞和 B 细胞互作共刺激多糖特异性 B 细胞迁移至生发中心进行分化成熟, 除了诱导多糖特异性的 IgM 到 IgG (IgG1 和 IgG3 为主) 的转换外, 还会形成多糖特异性记忆 B 细胞。外周循环中的多糖特异性抗体发挥中和作用, 能有效阻断病原菌的侵袭性感染; 而多糖特异性记忆 B 细胞又能保证在病原菌入侵时, 快速发生特异免疫应答从而控制感染。

多糖结合疫苗的免疫机制还包括由识别糖肽复合物中寡糖结构的多糖特异性辅助性 CD4⁺ T 细胞 (carbohydrate-specific helper CD4⁺ T cells, Tcarbs) 介导的免疫机制^[18]。Baker 等^[19]在 III 型 B 群链球菌 (type III group B *Streptococcus*, GBS III) 的荚膜多糖结合疫苗研究中发现, B 细胞内递呈糖肽复合物时, 机体存在 Tcarbs 亚群, Tcarbs 可促进多糖特异性 B 细胞的分化成熟以及免疫记忆的形成。进一步的研究发现, 在 TCV、Hib 荚膜多糖结合疫苗以及 I 型 b 群链球菌 (GBSI) 的荚膜多糖结合疫苗中也存在类似的 Tcarbs 亚群免疫应答机制^[18]。需要注意的是, 对于

MenC 荚膜多糖疫苗, 并不存在识别其多糖结构的 Tcarbs 亚群^[18]。这可能与 MenC 荚膜多糖结构有关: MenC 的荚膜多糖为 $\alpha,2-9$ 连接的线性唾液酸共聚物, 在 B 细胞内被酶解为较小的唾液酸单糖残基。在糖肽复合物由 B 细胞表面 MHC II 分子递呈给 CD4⁺ T 细胞的过程中, 由于唾液酸单糖结构较小不足以形成抗原表位被 MHC II 分子递呈, 因此 MenC 荚膜多糖结合疫苗免疫过程中激活的 T 细胞依然是以识别载体蛋白多肽为主。这也提示 MenC 多糖疫苗的增强免疫要使用相同的载体蛋白才能保证 B 记忆细胞的快速免疫应答。而 Tcarbs 亚群的存在提示理想的多糖结合疫苗应该富集糖肽抗原表位。

需要指出的是, 并不是所有的细菌胞外多糖都是 Ti 抗原。例如 MenA 的荚膜多糖是 Td 抗原, 在婴幼儿人群中初次免疫就能呈现出较强的免疫原性, 并形成部分免疫记忆^[20]。另外一些细菌的多糖属于两性离子多糖, 既能解离出阳离子又能解离出阴离子, 这类多糖属于 Td 抗原, 例如脆弱类杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 荚膜多糖 A1 (polysaccharide A1, PSA1)^[21] 和 I 型肺炎链球菌 (type 1 *S. pneumoniae*) 的荚膜多糖^[22]。

1.2 多糖结合疫苗的非糖单元

多糖结合疫苗的非糖单元可以是蛋白质或短肽、脂类, 以蛋白质居多。目前用于上市细菌多糖结合疫苗的载体蛋白有 5 种^[23]: 白喉毒素的交叉反应物 (cross-reacting material, CRM197)、破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT)、白喉类毒素 (diphtheria toxoid, DT)、脑膜炎耐瑟球菌外膜蛋白复合物 (meningococcal outer membrane protein complex, OMPC) 和流感嗜血杆菌蛋白 D (*H. influenzae* protein D, HiD)。多糖结合疫苗的载体蛋白通过共价键与多糖抗原结合, 在 B 细胞内该共价键不能被水解; 糖肽复合物中的肽段结构主要激活 CD4⁺ T 细胞, 从而促进多糖特异 B 细胞的分化成熟并形成记忆。载体蛋白也能诱导出针对蛋白质的记忆免疫, 如 CRM197 还能够通过抑制肿瘤细胞的增殖与迁移实现抗癌作用。有研究显示, 目前流行的 SARS-CoV-2 病毒与 PCV 中的载体蛋白 CRM197 之间存在可能的交叉抗原, 因此接种 PCV 在一定程度上能预防新冠病毒肺炎 (COVID-19)^[24-25]。另外, 机体接种相同载体蛋白的不同多糖结合疫苗, 免疫干扰发生的几率会升高, 载体蛋白特异抗体的存在会降低多糖特异抗体的浓度^[23]。

除了上述通用的载体蛋白外, 还有许多处于动

物实验和临床试验阶段的潜在载体蛋白,如铜绿假单胞菌外毒素 A (exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*, EPA)、艰难梭菌毒素 A (*Costridium difficile* toxin A, CDTA) 和毒素 B (*Costridium difficile* toxin B, CDTB) 的无毒性肽段、肺炎球菌表面蛋白 A (pneumococcal surface protein A, PspA)、肺炎球菌组氨酸三联蛋白 D (pneumococcal histidine triad D, PhtD)^[26]、脱毒的链球菌溶素 (detoxified pneumolysin, dPly) 和金黄色葡萄球菌 α -溶素 (Hla)^[27-28]。

2 多糖结合疫苗的合成方法

病原菌的胞外多糖种类繁多,结构复杂。因此,多糖结合疫苗最重要的质控指标是大规模功能性多糖成分的高纯度制备和多糖与蛋白质之间的高效共价结合。多糖结合疫苗的合成方法包括天然产物纯化、化学合成和生物合成等。

2.1 天然产物纯化方法

目前上市的大部分细菌多糖结合疫苗从细菌发酵的天然产物中纯化多糖成分,然后与载体蛋白化学结合。这类多糖结合疫苗最大的优势就是效力高,但面临的难以克服的问题是多糖结构的不均一性、提纯工艺的繁琐性、蛋白质共价结合的非重复性和不可控性以及其它细菌成分污染的风险性。

2.2 化学和生物化学合成方法

化学和生物化学的技术革新为多糖大规模合成带来可能性,除了传统化学合成方法外,还包括一锅法、化学合成-酶催化联合等方法^[29]。最早采用化学合成方法的商用多糖结合疫苗是 Hib 多糖结合疫苗 (Quimi-Hib[®] 1)^[30]。该疫苗模拟了 Hib 的荚膜多糖成分多聚核糖基核糖醇磷酸盐 (polyribosylribitol phosphate, PRP), 平均 7 个单位的核糖基核糖醇磷酸盐与破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT) 之间通过丙酰胺连接。该疫苗保证了多糖结构的均一性,同时在儿童群体中也具有 99.7% 的保护效率^[30]。不同长度 PRP 的合成 Hib 多糖结合疫苗也在陆续研究中,动物模型数据初步提示在合成的 Hib 多糖结合疫苗中,四聚体共轭物 2 (tetrameric conjugate 2) 能提供充分的抗原表位^[30]。

其他的商用细菌多糖结合疫苗依然采用细菌发酵后纯化的多糖,采用合成方法制备的细菌多糖疫苗大多处于动物实验或者临床试验阶段,这与多糖结构复杂和不稳定相关。以脑膜炎球菌多糖结合疫苗为例,目前商用的荚膜多糖结合疫苗主要针对 MenA、MenC、MenW135 和 MenY 这几个主要致

病株。MenA 的天然荚膜多糖结构为 $\alpha,1-6$ 连接的 2-乙酰胺-2-脱氧-D-磷酸甘露糖醇重复单元,在 3-OH 位置上存在 70%~80% 的 O-乙酰化,并且其中的磷酸二酯键具有水不稳定性。化学方法合成 MenA 非常不稳定,有研究显示最多只能合成 3 个 Men 寡糖重复单位,因此可采用一些特定修饰的功能基团替代生成具有稳定结构的 1-C-磷酸盐和碳环类似物,初步的动物实验显示其具有潜在的疫苗抗原性^[31]。肺炎链球菌根据荚膜多糖结构可分为 97 种血清型,目前的肺炎链球菌多糖结合疫苗 (pneumococcus conjugate vaccine, PCV) 也只能覆盖疫苗所含的血清型。因此,第三代肺炎链球菌疫苗的策略就是新结合疫苗 (neoglycoconjugates)^[32],即采用化学合成方法合成肺炎链球菌有效多糖表位,并在体内诱发免疫保护。目前肺炎链球菌血清型 2、3、5、6B、8、14 和 23F 的新结合疫苗在动物模型中已有报道,相对于商用的 PCV,这些新结合疫苗能诱导出更高水平的调理性抗体并维持更长时间的免疫记忆。

2.3 生物工程合成方法

生物工程方法合成多糖结合疫苗的策略有两种。一种是利用工程菌同时合成糖链和蛋白质并在细菌体内完成偶联,又称为蛋白质糖链偶联技术 (protein glycan coupling technology, PGCT)。一般使用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为模式菌,在胞质中的戊二烯焦磷酸盐类脂锚上合成多糖,然后转移至周质间隙在寡糖转移酶 (oligosaccharyl transferase, OTase) 的识别和作用下,将多糖转移至载体蛋白的偶联位点生成多糖蛋白结合物^[33]。目前使用这种方法的首选多糖结合疫苗包括肠源沙门菌 (*Salmonella enterica*)、志贺氏菌属 (*Shigella spp*)、大肠杆菌的脂多糖结合疫苗,以及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 血清型 5 和 8、肺炎克雷伯高毒株 (hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp) 以及肺炎链球菌的荚膜多糖结合疫苗等,均处于不同的动物实验和临床试验阶段。生物工程方法合成多糖结合疫苗的另一策略是利用膜抗原疫苗通用模块 (generalized modules for membrane antigens, GMMA) 和外膜囊泡糖工程 (glycoengineering of outer membrane vesicles, geOMVs)^[34]。G⁻ 细菌能释放外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs), 因此可通过基因编辑和去污剂处理调控 OMVs 生成过程。利用工程模式菌调控生成 OMVs 的过程即为 GMMA。GMMA 可以围绕核心结构脂质 A 进行毒力调控和结构重组,即 geOMVs^[34]。

这些 geOMVs 还表达细菌的 O- 多糖抗原, 又兼具免疫刺激的最适大小、内在佐剂功能以及 Toll 样受体激动剂等特点, 因此是良好的多糖结合候选疫苗生产平台。使用这种策略合成候选多糖结合疫苗的有尿路致病性大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) 血清型 O25B^[35]。

3 多糖结合疫苗面临的问题

3.1 保护性抗体未达到理想水平

目前使用的多糖结合疫苗的动物实验和临床试验数据显示, 按照现有免疫流程, 婴幼儿和青少年的免疫反应不同, 并且在成人人体内诱导出的保护性抗体水平仅是理想抗体水平的 10%~35%^[2,5], 此外在老年人中的抗体水平也不足^[32]。这说明多糖结合疫苗在不同人群中的免疫机制尚未被全面揭示。

3.2 免疫记忆的持续不稳定

多糖结合疫苗最大的优势就是能形成免疫记忆, 以保证在病原体侵袭感染时能迅速激发免疫应答, 产生特异性抗体阻断感染。因此, 特异性 B 细胞记忆的形成对阻断侵袭感染至关重要。B 细胞记忆形成至少需要 4 天, 而对于能在 4 天内形成侵袭性感染的病原菌如 MenC 来说^[9], B 细胞记忆反应有些滞后, 阻断感染只能依靠循环中持续的高水平保护抗体。此外, 目前使用的 PCV 在老年人中并未显示出高于传统荚膜多糖疫苗 (pneumococcal polysaccharide vaccine, PPV) 的抗体水平^[2,5]。

3.3 急需建立群体免疫

群体免疫是阻断病原体人群感染的最终途径, 过去 40 余年的多糖疫苗接种在全世界范围内显著降低了由这些细菌的侵袭性感染所造成的致畸率和致死率。群体免疫也是降低成本、节省资源的最有效方法, 同时减少了耐药性细菌的出现。

3.4 缺乏通用的细菌多糖结合疫苗设计原则

细菌多糖的结构存在不均一性, 不同长度和大小的多糖其抗原性也不尽相同。对于细菌多糖结合疫苗, 如何优化最佳长度、最佳大小的多糖抗原以及最适的多糖 / 蛋白质共价结合比例缺乏通用原则。此外, 现有的细菌多糖结合疫苗仅能覆盖其所含的血清型, 血清型之外的细菌仍是人类健康威胁。

4 结语

随着生物工程技术的发展, 细菌多糖结合疫苗研究将聚焦于揭示有功能的糖肽表位, 潜在的具有免疫调节功能的糖蛋白、糖脂以及两性离子多糖都

有可能成为候选疫苗^[36]。其中, 两性离子多糖既有高免疫原性又能形成免疫记忆, 是将来研发的重要 Td 抗原。对细菌多糖疫苗免疫机制的全面揭示也将大大促进对细菌性传染病的防控。

[参 考 文 献]

- [1] Sadarangani M. Protection against invasive infections in children caused by encapsulated bacteria. *Front Immunol*, 2018, 9: 2674-83
- [2] Rappuoli R. Glycoconjugate vaccines: principles and mechanisms. *Sci Transl Med*, 2018, 10: 1-6
- [3] Pollard AJ, Perrett KP, Beverley PC. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 213-20
- [4] van den Biggelaar AH, Pomat WS. Immunization of newborns with bacterial conjugate vaccines. *Vaccine*, 2013, 31: 2525-30
- [5] Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, et al. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8: 132
- [6] Fitz-Patrick D, Young M Jr, Scott DA, et al. A randomized phase 1 study of the safety and immunogenicity of 2 novel pneumococcal conjugate vaccines in healthy Japanese adults in the United States. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17: 2249-56
- [7] Hurley D, Griffin C, Young M, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV20) in adults 60 to 64 years of age. *Clin Infect Dis*, 2021, 73: e1489-97
- [8] Mbaeyi SA, Bozio CH, Duffy J, et al. Meningococcal vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep*, 2020, 69: 1-41
- [9] Pizza M, Bekkat-Berkani R, Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms*, 2020, 8: 1521
- [10] Berti F, Romano MR, Micoli F, et al. Carbohydrate based meningococcal vaccines: past and present overview. *Glycoconj J*, 2021, 38: 401-9
- [11] White C, Halperin SA, Scheifele DW. Pediatric combined formulation DTaP-IPV/Hib vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8: 831-40
- [12] Slack M, Esposito S, Haas H, et al. *Haemophilus influenzae* type b disease in the era of conjugate vaccines: critical factors for successful eradication. *Expert Rev Vaccines*, 2020, 19: 903-17
- [13] Wilck MB, Jin Xu Z, Stek JE, et al. Protective immune responses against *Haemophilus influenzae* type b elicited by a fully-liquid DTaP-IPV-Hib-HepB vaccine (VAXELIS). *Vaccine*, 2021, 39: 1428-34
- [14] Tsang RSW. A narrative review of the molecular epidemiology and laboratory surveillance of vaccine preventable bacterial meningitis agents: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus agalactiae*. *Microorganisms*,

- 2021, 9: 449
- [15] Simon R, Levine MM. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8: 494-8
- [16] Reddy R, Reddy B, Sarangi V, et al. A multi-centre, post-marketing surveillance study of Vi polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine (Typbar TCV^R) in India. *Hum Vaccin Immunother*, 2021: 1-7
- [17] Qamar FN, Batool R, Qureshi S, et al. Strategies to improve coverage of typhoid conjugate vaccine (TCV) immunization campaign in Karachi, Pakistan. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8: 697
- [18] Sun X, Stefanetti G, Berti F, et al. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 193-8
- [19] Baker CJ, Edwards MS, Kasper DL. Immunogenicity of polysaccharides from type III, group B *Streptococcus*. *J Clin Invest*, 1978, 61: 1107-10
- [20] Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, et al. Immune response of human infants of polysaccharide vaccines of group A and C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 1977, 136 Suppl: S31-5
- [21] Pathan EK, Ghosh B, Podilapu AR, et al. Total synthesis of the repeating unit of *Bacteroides fragilis* zwitterionic polysaccharide A1. *J Org Chem*, 2021, 86: 6090-9
- [22] Velez CD, Lewis CJ, Kasper DL, et al. Type I *Streptococcus pneumoniae* carbohydrate utilizes a nitric oxide and MHC II-dependent pathway for antigen presentation. *Immunology*, 2009, 127: 73-82
- [23] Broker M, Berti F, Schneider J, et al. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a "neglected valency" - potential and limitations. *Vaccine*, 2017, 35: 3286-94
- [24] Root-Bernstein R. Possible cross-reactivity between SARS-CoV-2 proteins, CRM197 and proteins in pneumococcal vaccines may protect against symptomatic SARS-CoV-2 disease and death. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8: 559
- [25] Root-Bernstein R. Age and location in severity of COVID-19 pathology: do lactoferrin and pneumococcal vaccination explain low infant mortality and regional differences? *Bioessays*, 2020, 42: e2000076
- [26] Feng S, Xiong C, Wang G, et al. Exploration of recombinant fusion proteins YAPO and YAPL as carrier proteins for glycoconjugate vaccine design against *Streptococcus pneumoniae* infection. *ACS Infect Dis*, 2020, 6: 2181-91
- [27] MacCalman TE, Phillips-Jones MK, Harding SE. Glycoconjugate vaccines: some observations on carrier and production methods. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2019, 35: 93-125
- [28] Berti F, Micoli F. Improving efficacy of glycoconjugate vaccines: from chemical conjugates to next generation constructs. *Curr Opin Immunol*, 2020, 65: 42-9
- [29] Mettu R, Chen CY, Wu CY. Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 9
- [30] Adamo R. Advancing homogeneous antimicrobial glycoconjugate vaccines. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 1270-9
- [31] Enotarpi J, Tontini M, Balocchi C, et al. A stabilized glycomimetic conjugate vaccine inducing protective antibodies against *Neisseria meningitidis* serogroup A. *Nat Commun*, 2020, 11: 4434
- [32] Bedeley E, Gori A, Yeboah-Manu D, et al. Control of streptococcal infections: is a common vaccine target achievable against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol*, 2021, 12: 658824
- [33] Harding CM, Feldman MF. Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. *Glycobiology*, 2019, 29: 519-29
- [34] Valguarnera E, Feldman MF. Glycoengineered outer membrane vesicles as a platform for vaccine development. *Methods Enzymol*, 2017, 597: 285-310
- [35] Kowarik M, Wetter M, Haeuptle MA, et al. The development and characterization of an *E. coli* O25B bioconjugate vaccine. *Glycoconj J*, 2021, 38: 421-35
- [36] Deng G, Zhang W, Ji N, et al. Identification of secreted O-mannosylated proteins from BCG and characterization of immunodominant antigens BCG_0470 and BCG_0980. *Front Microbiol*, 2020, 11: 407